

ブルー溶液を調製する。調製後、ろ紙を用いてろ過を行い不溶性成分を取り除く。試薬ビンはアルミホイルを用いて遮光し、一度オートクレーブにかけてから用いる。保存は室温でよく、特に無菌性は要求されないため、顕微鏡の横に常備しておくことよい。

使用に際しては、細胞懸濁液に終濃度 0.1 % トリパンブルーとなるように 10 分の 1 容量添加する。詳しい生存率の測定法は 5.3.3 項に述べる。

### 3.4.1 細胞の入手法

細胞を入手する方法はいくつかあり、研究機関や研究者から直接分与を受け、あるいは、日本の理化学研究所細胞開発銀行やアメリカの ATCC (American Type Culture Collection) などの半公的機関から分譲を受ける方法、そして、市販品を購入する方法などである。

#### 3.4.1.1 研究機関や研究者から分与を受ける場合

研究機関や研究者から直接分与を受ける場合には注意しなければならないことは、入手した細胞株は必ずしも標準資料株ではない、ということである。

例えば、遺伝子工学において、遺伝子導入のホスト細胞として一般によく用いられる CHO 細胞株の分与をある研究室から受けた場合に、その CHO 細胞株はその研究室で長期にわたって継代されたことにより変異してしまっており、ATCC などから入手できる標準資料細胞株とは変化している可能性があるということがある。このことの極端な例として、世界で初めて単離されたヒト腫瘍細胞株 HeLa 細胞は、研究者の数だけ亜株が存在するとまでいわれている。その研究室で樹立された細胞株であり、その研究室からしか入手することができない細胞株である場合は問題ないが、市販品として入手可能な一般化した細胞株に関しては、市販品を購入したほうが安心であろう。

研究室から分与を受ける場合の分与の方法は、凍結アンブルで分与を受ける方法と、培養状態で分与を受ける方法があり、それぞれに長所短所がある。ドライアイスブロックに凍結アンブルを埋め込み、その状態で確実に輸送できる

## 参考文献①

### 68 3. 器具および試薬の準備

ルターのボアサイズを小さくしていく工夫が必要である。まず 1.2 μm のフィルターでろ過を行い、0.8, 0.45 μm と順次ボアサイズを小さくしながらろ過を行い、0.22 μm のボアサイズのフィルターでいったんろ過した後、クリーンベンチ内で再度 0.22 μm のボアサイズのフィルターを用いて、最終的に滅菌のためのフィルターろ過を行うようにする。

滅菌後、タンパク質の定量を行い、PBS で 6 mg/mL に濃度を調整する。培地中には 0.5 % 添加し、終濃度 30 μg/mL 程度で用いるが、YLP に関しては細胞により要求性が異なるため、用いる細胞に対する最適濃度を求める必要がある。

#### 3.3.3 トリプシン溶液調製法

接着細胞を播代操作、または実験のために回収する場合は、一般にトリプシンを用いて剥がす。われわれは、特田製薬のウシ脾臓由来結晶トリプシン凍結乾燥製剤、トリプシリンを 0.02 % EDTA-PBS に溶解して用いている。0.02 % EDTA-PBS については、EDTA は 2 ナトリウム塩を、PBS は Mg<sup>++</sup> および Ca<sup>++</sup> を含まない PBS (-) を用いて調製し、オートクレーブ滅菌したものをしている。

トリプシリンは滅菌された標品であるため、滅菌した 0.02 % EDTA-PBS で溶解すればろ過滅菌の必要がない。トリプシリンは、1 バイアルにトリプシン 10,000 単位を含んでおり、これを 50 mL の 0.02 % EDTA-PBS で溶解し、1 mL 当たり 200 単位の溶液を調製する。4℃ 保存で、1 ヶ月は使用に耐える。力価が落ちた場合には新しく調製し直す。

#### 3.3.4 トリパンブルー溶液調製法

細胞の生死を判定する際に、色素排除能を指標としたトリパンブルー染色法が一般に用いられる。トリパンブルー色素を排除し、染色されない細胞を生細胞、色素を排除しきれずに青く染まる細胞を死細胞と判定する方法である。

粉末状のトリパンブルーを PBS に 1 % となるように溶解し、1 % トリパン

## REFERENCE DOCUMENT

### Reference document 1:

Title: Introduction to Cell Engineering

Published by: CORONA PUBLISHING CO., LTD., in 1994

Authors: Hiroki Murakami, Takuya Sugawara

(Partially excerpted from page 68) ←

#### 3.3.3 Preparation of trypsin solution

When collecting adhesive cells for subculturing or experiments, trypsin is generally used to detach such adhesive cells. We dissolve in 0.02% EDTA-PBS a product called Trypsillin which is a lyophilized product of a trypsin derived from bovine pancreas and produced by Mochida Pharmaceutical Co., Ltd. The 0.02% EDTA-PBS is prepared using EDTA-2Na and PBS (-) including neither  $Mg^{2+}$  nor  $Ca^{2+}$ , and is autoclaved before use.

Since the Trypsillin is a sterilized product, there is no need to filtrate the same for sterilization when dissolved in the 0.02% EDTA-PBS which has been sterilized. Such Trypsillin contains 10,000 units of trypsin in a vial, and is dissolved in the 0.02% EDTA-PBS of 50 mL, thus preparing a solution of 200 units/mL. The solution thus obtained remains usable for a month when preserved at 4°C, and will be newly prepared when the potency thereof has decreased.

### Reference document 2:

Title: Tissue Culture Technique (Basics)

Published by: Asakura Publishing Co., Ltd., in 1999

Authors: The Japanese Tissue Culture Association

(Partially excerpted from page 23)

#### c. Trypsin Solution

Trypsin 1:250 (Difco) of 2.5g is dissolved in CMF-PBS (see b in section 2-3-2) so as to obtain a solution of 1L. Since trypsin is not easily dissolved, the solution thus obtained is stirred overnight at 4°C. Particularly, trypsin is easily dissolved, if NaOH is added to the aforementioned solution to adjust the pH thereof to 8.0 before stirring such solution overnight at 4°C. The pH of a solution thus obtained is adjusted to 7.2 with HCl before filtration. However, the solution thus obtained is still usable even if the pH thereof is not adjusted. Before filtrating for sterilization with a membrane filter, filtration sterilization is performed on either a filtrate obtained by filtrating the solution prepared so far with a general filter paper, or a supernatant obtained by centrifugally separating the solution prepared so far for 10 minutes and at a speed of 10,000rpm. A trypsin solution prepared in this manner is used in the range of 0.05-0.25% in accordance with the intended use.